

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3399526号

(P3399526)

(45) 発行日 平成15年4月21日 (2003.4.21)

(24) 登録日 平成15年2月21日 (2003.2.21)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

A 6 1 K 47/36

C 0 8 L 5/08

識別記号

F I

A 6 1 K 47/36

C 0 8 L 5/08

請求項の数23(全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平3-514243  
(86) (22) 出願日 平成3年6月25日 (1991.6.25)  
(65) 公表番号 特表平5-508161  
(43) 公表日 平成5年11月18日 (1993.11.18)  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 1 / 0 4 5 4 3  
(87) 国際公開番号 W O 9 2 / 0 0 0 1 0 5  
(87) 国際公開日 平成4年1月9日 (1992.1.9)  
審査請求日 平成10年1月8日 (1998.1.8)  
審判番号 不服2001-22086(P2001-22086/J1)  
審判請求日 平成13年12月10日 (2001.12.10)  
(31) 優先権主張番号 5 4 3 , 1 6 3  
(32) 優先日 平成2年6月25日 (1990.6.25)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999  
ジェンザイム、コーポレーション  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ボ  
ストン、ニールランド、ストリート、75  
(72) 発明者 バーンズ、ジェームズ ダブリュ.  
アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ホ  
リントン、フィスク、ストリート、548  
(74) 代理人 999999999  
弁理士 佐藤 一雄 (外2名)

合議体

審判長 竹林 則幸

審判官 守安 智

審判官 松浦 新司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸の非水溶性誘導体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】ゲルを形成するために十分な条件下において水溶液中で、0.4~2.6%w/w範囲内の濃度でのヒアルロン酸、ポリアニオン系多糖、及びカルボジイミドからなる活性化剤を混和することからなる非水溶性生物適合性ゲルの製造方法。

【請求項2】ポリアニオン系多糖がカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】ポリアニオン系多糖がカルボキシメチルセルロースである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】ポリアニオン系多糖がカルボキシメチルアミロースである、請求項2に記載の方法。

【請求項5】ヒアルロン酸及びポリアニオン系多糖が一緒に加えられ、しかる後活性化剤が加えられる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】ポリアニオン系多糖が活性化剤と混和され、しかる後ヒアルロン酸が加えられる、請求項1に記載の方法。

【請求項7】ヒアルロン酸が活性化剤と混和され、しかる後ポリアニオン系多糖が加えられる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】カルボジイミドが1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドからなる、請求項1に記載の方法。

【請求項9】ポリアニオン系多糖が0.005~0.1Mの濃度で存在する、請求項1に記載の方法。

【請求項10】ポリアニオン系多糖が0.01~0.02Mの濃度で存在する、請求項9に記載の方法。

【請求項11】方法が4.0~5.0のpHで実施される、請求項1に記載の方法。

【請求項12】ポリアニオン系多糖対活性化剤のモル比が少くとも1:1である、請求項1に記載の方法。

【請求項13】ポリアニオン系多糖対活性化剤のモル比が約1:4である、請求項12に記載の方法。

【請求項14】請求項1の方法に従い製造された非水溶性生物適合性ゲル。

【請求項15】ヒアルロン酸、ポリアニオン系多糖、及びカルボジイミドからなる活性化剤の反応生成物からなる非水溶性生物適合性ゲル。

【請求項16】カルボジイミドが1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドからなる、請求項15に記載のゲル。

【請求項17】ゲル内に分散された薬学上活性な物質を更に含む、請求項15に記載のゲル。

【請求項18】薬学上活性な物質が成長因子、酵素、薬物、バイオポリマー及び生物学上適合しうる合成ポリマーからなる群より選択される、請求項17に記載のゲル。

【請求項19】ポリアニオン系多糖がカルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルアミロース、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸からなる群より選択される、請求項15に記載のゲル。

【請求項20】ポリアニオン系多糖がカルボキシメチルセルロースである、請求項19に記載のゲル。

【請求項21】ポリアニオン系多糖がカルボキシメチルアミロースである、請求項19に記載のゲル。

【請求項22】ゲルが付着防止組成物の形である、請求項15に記載のゲル。

【請求項23】組成物が膜の形である、請求項22に記載のゲル。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 発明の背景

本出願は1987年9月18日付で出願された“ヒアルロン酸の非水溶性誘導体”と題するHamiltonらの米国特許出願第07/100,104号の一部継続出願である。本発明は化学的に修飾されたヒアルロン酸から形成される生物適合性フィルム及びゲルに関する。

ヒアルロン酸“HA”は例えば滑液、硝子体液、血管壁及び臍帯と他の結合組織で見られる天然ムコ多糖である。多糖は交互の $\beta$  1-3 グルクロニド及び $\beta$  1-4 グルコサミニド結合により結合された交互のN-アセチル-D-グルコサミン及びD-グルクロン酸残基からなり、そのため反復単位は(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-GlcA(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-GlcNAcである。水中にヒアルロン酸は溶解して高粘性の液体を形成する。天然源から

単離されたヒアルロン酸の分子量は通常 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$ ダルトンの範囲内である。

ここで用いられる“HA”という用語はヒアルロン酸と例えばヒアルロン酸ナトリウム(ナトリウム塩)、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸マグネシウム及びヒアルロン酸カルシウムを含めたそのヒアルロン酸塩のいずれかを意味する。

化学的に修飾(“誘導”)された形のHAは術後期間中に体組織の付着又は癒着を防止するため外科補助物として有用である。誘導化HAゲル又はフィルムは相互付着を阻止するために分離したままにされるべき組織間の箇所中に注入又は挿入される。有効であるためには、ゲルはそのゲルが最後に分散して組織が接触したときにそれらがもはや付着する傾向を有しないほど十分に長い時間にわたり適所に留まって組織接触を妨げねばならない。

化学的修飾HAは制御的放出薬物デリバリー上も有用である。Balazsら, 1986年, 米国特許第4,582,865号明細書では“HAの架橋ゲルは、それに分散されているが、該ゲル高分子量マトリックスに共有結合されていない低分子量物質の放出を遅らせることができる”と述べている。T.J. Roseman et al., Controlled Release Delivery Systems (制御的放出デリバリーシステム), Marcel Dekker, Inc., New YorkにおいてR.V. Sparer et al., 1983, Chapter 6, pages 107-119では直接的に又は中間結合基としてアラニン架橋を含むエステル複合体のいずれかにより、エステル結合を介してヒアルロン酸に共有結合されたクロラムフェニコールの徐放性について記載している。

I. Danishefsky et al, 1971, Carbohydrate Res., Vol. 16, pages 199-205では水溶液中1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(“EDC”)の存在下においてムコ多糖をアミノ酸エステルと反応させることでムコ多糖のカルボキシル基を置換アミドに変換することによるムコ多糖の修飾について記載している。彼等はグリシンメチルエステルをHAを含めた様々な多糖と反応させた。得られる生成物は水溶性である; 即ち、それらは水中又は体組織間で出会うような水性環境中において急速に分散する。

HA組成物を低水溶性にする提案としてはHAを架橋することがある。T.J. Roseman et al., Controlled Release Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York においてR.V. Sparer et al., 1983, Chapter 6, pages 107-119ではシステイン残基をアミド結合でHAに結合し、しかる後結合されたシステイン残基間でジスルフィド結合を形成させてシステイン修飾HAを架橋させることによるHAの修飾について記載している。システイン修飾HAはそれ自体水溶性であり、ジスルフィド形への酸化による架橋時のみ非水溶性となった。

De Belderらの国際出願公開第W086/00912号明細書では二又は多機能性エポキシドでカルボキシル含有多糖を

架橋することにより製造される術後組織付着防止用の徐分解性ゲルについて記載している。低い水溶解性を有するHAの架橋ゲルを製造するために提案された他の反応性二又は多機能性試薬としては:50℃でアルカリ性媒体中における1, 2, 3, 4-ジエポキシブタン (T. C. Laurent et al., 1964, Acta Chem. Scand., vol. 18, page 274) ; アルカリ性媒体中におけるジビニルスルホン (E. A. Balasz ら, 米国特許第4, 582, 865号, 1986年) ; ホルムアルデヒド、ジメチロール尿素、ジメチロールエチレン尿素、エチレンオキシド、ポリアジリジン及びポリイソシアネートを含めた様々な他の試薬 (E. A. Balasz ら, 英国特許出願第84 20 560号, 1984年) がある。T. Malson ら, 1986年, 国際出願公開第W086/00079号明細書ではHAを二又は多機能性エポキシドのような二又は多機能性架橋試薬と反応させることにより硝子液体代替物として使用されるHAの架橋ゲルの製造について記載している。T. Malson ら, 1986年, 欧州出願第0 193 510号明細書では架橋HAゲルを真空乾燥又は圧縮することによる成形品の製造について記載している。

#### 発明の要旨

本発明はゲルを形成するために十分な条件下でHA、ポリアニオン系多糖及び活性化剤を混和することによる非水溶性ゲルの製造方法の特徴とする。

好ましいポリアニオン系多糖としてはカルボキシメチルセルロース (“CMC”)、カルボキシメチルアミロース (“CMA”)、コンドロイチン-6-硫酸、デルマチン硫酸、ヘパリン及びヘパリン硫酸がある; CMC及びCMAが特に好ましい。HA及びポリアニオン系多糖と一緒に添加でき、しかる後活性化剤が加えられるか又はポリアニオン系多糖は活性化剤しかる後HA添加で混和してもよい。もう1つの選択肢は活性化剤及びHAを混和し、しかる後ポリアニオン系多糖を加えることである。

反応を実施する上で好ましいpHは4.0~5.0である。多糖に関して好ましい濃度は0.005~0.1M、更に好ましくは0.01~0.02Mである。多糖対活性化剤のモル比は好ましくは少くとも1:1、更に好ましくは約1:4である。好ましい活性化剤はカルボジイミド、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジドである。

ゲルは付着防止組成物の形で、例えば膜の形で又はシリンジでの配合用に適した組成物の形で提供される。それはそれ全体に分散された薬学上活性な物質を含有してもよい; このようなケースにおいて、ゲルは薬物デリバリーシステムとして有用である。適切な物質としては成長因子、酵素、薬物、バイオポリマー及び生物学上適合しうる合成ポリマーがある。

ここで用いられる“フィルム”という用語はゲルを圧縮するか又はゲルを脱水することで形成される物質を意味し、本発明のいかなるゲルもこのようなフィルムに形

成してよい。

“生物適合性”物質とは、その用語がここで用いられるように、生物学的機能に関して医学上許容されない毒性又は有害効果を有しない物質である。

“ポリアニオン系多糖”とは約4.0以上のpH値で2以上の負荷電基、例えばカルボキシル基を有する多糖である。

我々はHAを適切な活性化剤及びポリアニオン系多糖で処理することによりいかなる別添加される二又は多機能性架橋試薬も使用せずに低い水溶解性を有するゲル又はフィルムが得られることを発見した。

“水溶性”ゲル又はフィルムとは(該用語が本明細書において用いられているように)、水中1%重量/重量 (“w/w”) ヒアルロン酸ナトリウムの水溶液を乾燥することにより形成される寸法3cm×3cm×0.3mmを有するものであり、これを20℃で蒸留水50mlのビーカー中にいれて攪拌せずに放置した場合に3分間後にフィルムとしてのその構造上の一体性を失い、20分間以内で全部分散されてしまうようなものをいう。本発明の“非水溶性”フィルム(該語句及び類似用語が本明細書において用いられる)は、HAの1%水溶液を用いて形成され、本発明に従い修飾され、同寸法を有し、同様に20℃で蒸留水50mlのビーカー中攪拌せずに放置された場合20分間後でも構造上完全なままである; 即ち、フィルム境界及び端部は24時間後にもなお存在するが、但しそのフィルムは膨潤されている。

HAは、それがHAにおけるカルボキシル基を求核攻撃され易くするか又はポリアニオン系多糖と非水溶性ゲルを形成し易くするように水性混合液中で処理された場合に、その用語がここで用いられるように、“活性化”されると言われる; “活性化”とはHA含有水性混合液中でHAをそのように活性化させる物質である。

ゲル及びフィルムは非水溶性であるため、それらは未反応物質を除去するため使用前に水で十分に洗浄することができる。

本発明のフィルム及びゲルは反応混合液中に色素又は染料を含有させることで着色形に製造することもできる。このような着色フィルム及びゲルは適所にあるか又は配置中により見易くでき、手術操作中に取扱う上でそれらを無色物よりも容易にする。

多糖修飾フィルム及びゲルは水和された場合であつてもそれらの強度を留める。それらは縫合の必要性なしに生物組織に付着するため、それらは術後付着防止膜として有用である。それらは出血の存在下でも組織に適用できる。

本発明の他の特徴及び利点はその好ましい態様の以下の記載及び請求の範囲から明らかであろう。

#### ポリアニオン系多糖修飾HA

ポリアニオン系多糖修飾HAゲル及びフィルムは非水溶性物質を形成するため(前記のような)HAをポリアニオン

ン系多糖及び活性化剤と混和することにより通常製造される。沈澱物は術後付着防止に有用な薄膜に流延できる。それは前記のように着色してもよい。沈澱物から流延されたフィルムの強度を増加させるため、フィルムはそれらが真空中（約30mmHg）約105℃で24時間加熱される脱水熱処理に付してもよい。

多糖及びHAは一緒に混和でき、しかる後活性化剤が加えられる。一方、多糖は活性化剤と反応させ、しかる後HAを添加してもよい。第三の選択肢はHAを活性化剤と混和し、しかる後多糖を加えることである。好ましい活性化剤としては前記されており、カルボジイミド類のEDC及びETCがある。反応は4～5のpHで実施されることが好ましい。好ましい多糖濃度は0.005～0.1Mの範囲内であり、更に好ましくは0.01～0.02Mの範囲内である。多糖対活性化剤の好ましいモル比は少くとも1:1、更に好ましくは約1:4である。

#### 関連技術の説明

##### リジン修飾HA

関連技術によるゲル及びフィルムは通常下記のようにして得られる。HAは水に溶解され、得られた水性混合液のpHは下方に調整される；次いで溶解されたHAは適切な活性化剤を混和することにより活性化され、適切なリジンエステルが活性化HAと混和され、望ましいゲルが形成するまで放置される。活性化剤及びエステルはどんな順序で混和してもよい。

関連技術によるリジン修飾ゲル及びフィルムの好ましい製造方法はここで更に詳細に記載される。当業者であれば認識するように、関連技術によるゲル及びフィルムは本発明の方法に属するが、但しここで記載されたものとは特に異なるプロトコルを用いて得ることもできる。

ヒアルロン酸又はヒアルロン酸ナトリウムのようなヒアルロン酸の塩のサンプルは水性混合液を得るため水に溶解される。様々な供給源のうちいずれからのHAも使用できる。周知のように、HAは動物組織から抽出できるか又は細菌醗酵の産物として回収できる。ヒアルロン酸は例えば国際出願公開第W086/04355号明細書に記載されるようにバイオプロセス技術により商業的量で産生できる。好ましくはこの第一水性混合液中におけるHAの濃度は0.4～2.5%重量/重量（“w/w”）の範囲内である。その後の反応はそれより有意に低い濃度のとき遅くて有効性が小さくなり、一方それより有意に高い濃度のときはそれらの高粘性のため取扱いが困難である。

水性HA混合液は酸性であって、好ましくはpH4.0～5.0、更に好ましくはpH4.3～4.75を有するべきである。それより低いpH値のとき好ましい活性化剤EDCは不安定であり、それより高い値のとき反応速度は減少する。好ましくはヒアルロン酸はpHを調整するために加えられるが、但し他の公知の酸も使用できる。

水性HA混合液のpHが調整されると、活性化剤が混和さ

れる。好ましい活性化剤としてはカルボジイミド、最も好ましくはEDC（一部の参考文献においてこの物質は1-（3-ジメチルアミノプロピル）-3-エチルカルボジイミド又は“DEC”と称される）又はETC（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミドメチオジド）がある。

次いで求核性リジンエステルが水性HA活性化剤混合液に混和される。好ましいエステルとしてはメチル、エチル又はt-ブチルエステルがある。リジンはジリジン、トリリジンもしくはポリリジン又はそれらの塩酸塩の形でよい。

リジンエステル及び活性化剤は全部一度に又は徐々にいずれかでどんな順序によりpH調整HA混合液に混和してもよい。

着色生成物が望まれるならば、サーバ（Serva）により“サーバブルー”として販売される、“クマシー（Coomassie™）ブリリアントブルーR-250”としても知られるブルー色素“ブリリアントブルーR”のような色素又は染料の溶液がこの時点で反応混合液に混和できる。得られる生成物は体組織の色と良いコントラストを示せる青色を有し、そのためそれが手術時に取扱われるとき及びそれが適所におかれたときフィルム又はゲルを見易くする。

試薬（及び存在するとすれば染料又は色素）が混和されると、反応混合液は単純にしばらく放置されるかあるいはそれは継続的に又は時々攪拌又はかきまぜられる。

試薬の混和時にpHは上昇するが、反応が進行しても酸の添加で所望のpHに維持できる。しかしながら、我々は様々な望ましい物理的性質のフィルム及びゲルが反応が進行するに従いpHを単純に上昇させることにより得られることを発見した。試薬、特にEDC及びリジンエステルの添加方式は重要でないが、但しこれらの試薬対HAの比率は重要である。我々はHA:EDC:リジンエステルの比率が1:2:1～1:4:10の範囲であるときに最良の結果が得られることを発見した。値が低いほど典型的には弱くてさほど不溶性でない生成物が得られ、一方値が高いほど典型的には強くてより不溶性の生成物が得られる。

#### フィルム形成

上記に従い修飾されたHAは直接的なやり方でフィルムとして流延できる。典型的には反応混合液は望ましいサイズ及び形状を有する容器内に注がれ、風乾される。一般に、低い表面積/容量を有するようにどろどろして注入された混合液を乾燥させることで形成されたフィルムは、さらさらした高い表面積/容量の混合液を乾燥させることで形成されたフィルムよりも大きな強度を有する。

別法として、フィルムは、例えば欧州出願第0 193 510号明細書に記載されたように、例えば少くとも一方が多孔質である2表面間でゲルを圧縮するようにして水を逃がせる条件下でゲルを圧縮することにより形成で

きる。

所望であれば、ゲル又はフィルムは例えば水又は1M水性塩化ナトリウムによる淹流で使用前に洗浄してよい。一方反応混合液はフィルムとして流延する前に残留試薬を除去するため透析してもよい。残留試薬又は置換尿素のような試薬由来物質を除去するための洗浄はフィルム又はゲルが治療用途に用いられるならば望ましい。前記のようにブリリアントブルーRで青色に着色されたゲル又はフィルムはこのような洗浄中にそれらの着色を失わない。試薬又は反応生成物の除去は高圧液体クロマトグラフィーでモニターすることができる。

#### 発明の具体的な説明

本発明は下記例で更に詳細に記載される。これらの例は説明のために示され、請求の範囲で記載された場合を除き本発明を制限するためではない。

例1: この例はCMC修飾HAの製造について示している。

HA (0.4%w/w, 0.01M) と250,000の分子量及び0.65~0.90範囲内の置換度を有するアクアロン (Aqualon) タイプCMC (0.19%w/w, 0.01M) を室温で水溶液中一緒に混合した。混合液のpHを1M HClの添加でpH4.7~4.8に調整して維持した。この溶液の各100mlにEDC0.67g (0.04M) を加えた。EDCとの反応中、溶液のpHを0.1M HClの添加でpH4.7~4.8に維持し、反応を1時間進めたところ、その間に沈殿物が生成した。未反応EDCは3及び19時間目に2回透析物交換して24時間にわたり酸性水 (pH4.0) に対する透析により沈殿物から除去した。次いでHA/CMCスラリーを平坦な型に流延し、室温で24時間風乾した。

HA/CMC膜は実験動物モデルで術後付着形成の発生率を減少させることが示された。ラット盲腸剥離モデルを用いた実験において、HA/CMC膜を外科的に剥離されたラット盲腸の周囲においた；事前の研究では付着が制御的方式で剥離されたラットの盲腸に容易に生じることを証明した。HA/CMC膜又はORC膜〔付着防止用にジョンソン&ジョンソン (Johnson & Johnson) から市販されるインターシード (Interceed) TC7膜〕のいずれかを受容した動物群における盲腸付着は、盲腸が剥離されたが但しかなる膜も受容しなかった動物における付着コントロールと比較した。これら実験の結果はHA/CMC膜がコントロール動物及びインターシードTC7フィルムを受容した動物と比較して付着形成を一貫して減少させることを示した。

以下の例2~例18は求核剤を用いた参考例である。

例2: この例では活性化剤としてEDC及び求核剤としてロイシンメチルエステル塩酸塩を用いてヒドロゲルを製造した。

$1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  の分子量を有するヒアルロン酸ナトリウム (400mg; 1.0mmolのカルボキシル基) を蒸留水10mlに溶解した。水溶液のpHは0.1NHClの添加でpH4.75に調整した。次いでEDC314mg (1.64mmol) をすべて一度に、

しかる後L-ロイシンメチルエステル塩酸塩190mg (1.05mmol) を加えた。その後反応混合液のpHは2時間で6.2まで上昇した。反応混合液を室温で5時間保った後、それは濃厚な不溶性ヒドロゲルを形成した。このヒドロゲルはその物理的性質の喪失なしに残留試薬を除去するため1M NaCl溶液で洗浄することができた。

例3: この例では様々なEDC/ロイシン:HA比をゲル形成及び性質の比較のために用いた。

操作は例1のとおりであって、水15ml中ヒアルロン酸ナトリウム (400mg; 1.0mmolのカルボキシル基) を用いた。次いで別々の実験において下記量のEDC及びロイシンメチルエステル塩酸塩を加えた: EDC153mg (0.8mmol) /ロイシンメチルエステル塩酸塩182mg (1.0mmol); EDC76mg (0.4mmol) /ロイシンメチルエステル塩酸塩90mg (0.5mmol); EDC38mg (0.2mmol) /ロイシンメチルエステル塩酸塩45mg (0.25mmol)。強いヒドロゲルはEDC及びロイシンメチルエステル塩酸塩の最大比率のとき例1のように得られた。最小比率の試薬 (0.2mmol/0.25~1.0mmol HAカルボキシル基) のときは弱いゲルを得たが、これは2週間後液体に崩壊した。

例4: この例ではHA濃度を得られるゲル性質の比較のため半分に減少させた。

操作は例1のとおりであったが、但しHA (400mg; 1.0mmolのカルボキシル基) を15mlではなく30mlの水に溶解した (1~1/3%w/w HA)。ヒドロゲルを形成したが、但しそれは例1で得られた場合よりも弱かった。

例5: この例では活性化剤としてEDC及び求核剤としてロイシンメチルエステル塩酸塩を用いてフィルムを製造した。

ヒアルロン酸ナトリウム (400mg; 1.0mmolのカルボキシル基) を蒸留水40mlに溶解した。溶液のpHは0.1N NaClの添加でpH4.75に調整した。次いでEDC (314mg; 1.64mmol) を一度に、しかる後L-ロイシンメチルエステル塩酸塩190mg (1.05mmol) を加えた。反応混合液のpHは2時間で6.2まで上昇したが、しかる後溶液を面積6360mm<sup>2</sup>のペトリ皿中に注ぎ、2日間かけてフィルムになるまで乾燥させた。こうして得られたフィルムは強く、水及び1M水性NaClに不溶性であった。そのフィルムはそれらの物理的性質の喪失なしに残留試薬を除去するため例1のように水又は水性NaClで洗浄することができた。このようなフィルムの赤外線スペクトル測定分析では約2130cm<sup>-1</sup>でカルボジイミド吸収を示さず、約1740cm<sup>-1</sup>、1700cm<sup>-1</sup>、1650cm<sup>-1</sup>及び1550cm<sup>-1</sup>で吸収を示した。

例6: この例では様々なHA濃度を得られるフィルム性質の比較のためフィルム製造で用いた。

例4で記載された操作を繰返し、蒸留水30ml、40ml又は100mlにHA (400mg; 1.0mmolのカルボキシル基) を溶解して得られる3種の異なる初期HA濃度を用いた。これら各々の初期濃度のHAを用いて得られたフィルムは強く、水及び1M水性NaClに不溶性であり、ある濃度範囲のHAが

使用できることを示した。これらフィルムの各々はその物理的性質の喪失なしに水又は水性NaClで洗浄することができた。

例7: この例では、フィルムを形成した後にそれを洗浄する場合と比較するため、フィルムを形成するため流延する前に反応混合液を透析する効果について示している。

ヒアルロン酸ナトリウム（水40ml中400mg）、EDC（314mg; 1.64mmol）及びL-ロイシンメチルエステル塩酸塩（190mg; 1.05mmol）を例4のように反応させた。反応終了（2時間）時に反応混合液は残留試薬を除去するため12,000NMWカットオフ透析管で水に対して透析した。次いで透析された混合液を例4のようにフィルムとして流延した。こうして得られたフィルムは強く、水又は1M水性NaClに不溶性であった。

例8: この例においてフィルムは異なる表面積/容量で混合液を乾燥させて得られたフィルムの性質を比較するためより粘稠に注がれた反応混合液を乾燥することで形成した。

例4のようにして得られた反応混合液（反応液容量40ml）を小さなペトリ皿（面積3330mm<sup>2</sup>）に流延した。こうして得られたフィルムは1M水性NaCl及び水（100℃; 1時間）に不溶性であった。

例9: この例においてフィルムは他のアミノ酸エステル及びEDCで活性化されたHAを用いて製造した。

HAの溶液（H<sub>2</sub>O 40ml中400mg）を0.1NHClでpH4.7にした。次いでEDC（314mg; 1.6mmol）をすべて一度に、しかる後アミノ酸誘導体1mmolを加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させた。不溶性フィルムはL-バリンメチルエステル塩酸塩、L-イソロイシンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩及びL-フェニルアラニンメチルエステル塩酸塩から得た。

例10: この例においてフィルムは求核剤として単純な一級アミン（アニリン）を用いて製造した。

HAの溶液（H<sub>2</sub>O 40ml中400mg）を0.1NHClでpH4.7にした。次いでEDC（314mg; 1.6mmol）をすべて一度に、しかる後アニリン1mmolを加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させ、不溶性フィルムを得た。

例11: この例においてフィルムはロイシンの他のエステルを用いて製造した。

HAの溶液（H<sub>2</sub>O 40ml中400mg）を0.1NHClでpH4.7にした。次いでEDC（314mg; 1.6mmol）をすべて一度に、しかる後ロイシンエステル1mmolを加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させた。不溶性フィルムはL-ロイシンエチルエステル塩酸塩及びL-ロイシンイソブチルエステル塩酸塩の双方から得た。

例12: この例においてゲルは他のアミノ酸メチルエステルを用いて製造した。

HAの溶液（H<sub>2</sub>O 15ml中400mg）をpH4.7にし、EDC（314mg; 1.6mmol）しかる後アミノ酸誘導体（1mmol）を加え

た。反応混合液は5～24時間以内で濃厚なゲルを形成した。非水溶性ゲルはL-バリンメチルエステル塩酸塩、L-イソロイシンメチルエステル塩酸塩、L-アルギニンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩及びL-ヒスチジンメチルエステル塩酸塩を用いて得た。

例13: この例においてフィルムは求核剤としてアミノ酸アミド（ロイシンアミド）を用いて製造した。

HAの溶液（H<sub>2</sub>O 40ml中400mg）を0.1NHClでpH4.7にした。次いでEDC（314mg; 1.6mmol）をすべて一度に、しかる後L-ロイシンアミド塩酸塩1mmolを加えた。反応混合液をペトリ皿に注ぎ、乾燥させ、不溶性フィルムを得た。

例14: この例においてゲルはロイシンエチルエステル塩酸塩を用いて製造した。

HAの溶液（H<sub>2</sub>O 15ml中400mg）をpH4.7にし、EDC（314mg; 1.6mmol）しかる後ロイシンエチルエステル塩酸塩（1.0mmol）を加えた。混合液は5～24時間以内で濃厚な非水溶性ゲルを形成した。

例15: この例においてフィルム及びゲルはHA活性化剤としてETCを用いて製造した。

$1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  ドルトン範囲内の分子量を有するヒアルロン酸ナトリウム（400mg; 1.0mmol）のカルボキシル基）を水（10ml及び30ml）に溶解した。各水溶液のpHは0.1N HClの添加でpH4.75に調整した。次いでETC475mg（1.6mmol）をすべて一度に、しかる後L-ロイシンメチルエステル塩酸塩190mg（1.05mmol）を加えた。この反応混合液のpHは次の2時間でpH6.2まで上昇した。水10mlを含有した反応混合液は不溶性ゲルを形成した。水30mlを含有した反応混合液は乾燥後に不溶性フィルムを生じた。

例16: この例は着色フィルムの製造について示している。

HAの溶液（H<sub>2</sub>O 30ml中400mg）を例13のようにpH4.75にし、しかる後ETC（475mg; 1.6mmol）及びロイシンメチルエステル塩酸塩（190mg; 1.05mmol）を加えた。次いでH<sub>2</sub>O（0.5ml）中“サーブブルー”（5mg/ml）の希溶液を反応混合液に加えた。得られた混合液をペトリ皿に注ぎ、非水溶性ブルーフィルムを16時間後に得た。青色はフィルムが1M NaClしかる後H<sub>2</sub>Oで洗浄された後もフィルムに残留した。

例17: この例は化学的修飾HAのフィルムの組織生物適合性について示している。

例4で記載された操作に従い製造されたフィルム4片及び2つのUSP陰性コントロール片をホワイトニュージャーランドウサギ（2匹/試験）の脊椎傍筋肉中に外科的に埋め込んだ。試験部位は72時間後に肉眼的に又は7日間後に完全組織病理学的にいずれかで評価した。USP XX I, p. 1237によれば、試験物質はプラスチック物質の評価に関するUSP埋込み試験の要求を満たした。

例18: この例はリジン修飾HAの製造について示している。

水中HAの0.4% (w/w) 溶液を調製した。この溶液のpHは酸の添加で4.3~4.75に調整した。この溶液の各100mlにEDCが完全に溶解するまで攪拌しながらEDC0.76gを加えた。HA/EDC溶液の各100mlにLMEが完全に溶解するまで攪拌しながらリジンメチルエステル (LME) 0.20gを加えた。HA、EDC及びLMEの添加は室温で行った；最終HA/EDC/LME溶液が形成されたら、それを必要になるまで4℃で貯蔵した。

LME修飾HA物質は最終用途に応じて様々な形状、大きさ及び粘稠度に加工できる。物質の薄いシートが望まれるならば、混合液は平坦な表面上に注ぐことができる。次いでこの物質は環境又は高温下で水を蒸発させることにより固体に変えることができる。物質のシートを得る代替法はそれを凍結乾燥に付すことである。最終生成物の孔径は初期凍結温度を調整することでコントロールできる。湾曲表面及び他の形状は最初にゲルを陰像表面上に流延してから記載されたように加工することで同様に得られる。乾燥されたシートは所望であればカーバー (Carver) 実験室用プレスで所定厚さに圧縮することにより更に加工できる。これは間隔が制限された解剖学的

構造間に薄いフィルムをいれることを要する用途において特に有用である。

標準塩水中で再水和された凍結乾燥物質の機械的試験では170~900g/cm<sup>2</sup>の破断値まで力を生じた。この物質に関する破断値までの伸び率は33~62%であった。

#### 用途

本発明のフィルム又はゲルは、例えばDeBellderらの国際出願公開第W086/00912号明細書に記載されるように、外科業界で公知の操作に従い術後又は治癒期間中に体組織の付着又は癒着を防止するため外科補助物として使用できる。手術中に適切な1以上のゲル又はフィルム片が分離したままにされる組織間に挿入又は注入される。

本発明のフィルム又はゲルは徐放性薬物デリバリー用にも使用できる。デリバリーされる薬物は、例えばT. J. Roseman et al., Controlled Release Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York. においてR. V. Sparer et al., 1983, Chapter 6, pages 107-119に記載されたように、ゲル又はフィルムに共有結合させることができる；こうしたゲル又はフィルムはデリバリーが望まれる箇所に埋込み又は注入することができる。

#### 他の態様

他の態様も下記請求の範囲内に属する。

#### フロントページの続き

- (72) 発明者      コックス, スティーブン  
                  アメリカ合衆国マサチューセッツ州、ボ  
                  ストン、コモンウェルス、アベニュー、  
                  1127、アパートメント 3
- (72) 発明者      ウォルツ, アラン イー  
                  アメリカ合衆国マサチューセッツ州、レ  
                  ディング、ワン、サミット、ドライブ、  
                  ナンバー 46

- (56) 参考文献      特表 昭61-502729 (JP, A)  
                  国際公開89/2445 (WO, A1)

- (58) 調査した分野(Int. Cl. 7, DB名)  
                  A61K 47/36  
                  C08L 5/08